

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005144

International filing date: 22 March 2005 (22.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-084992
Filing date: 23 March 2004 (23.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 4 9 9 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 8 4 9 9 2
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 株式会社ディナベック研究所

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	040610
【提出日】	平成16年 3月23日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	A61K C12N
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県名古屋市名東区梅森坂5-101 国立東名古屋病院内
【氏名】	林 衆治
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
【氏名】	井上 誠
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
【氏名】	長谷川 護
【特許出願人】	
【識別番号】	595155107
【氏名又は名称】	株式会社ディナベック研究所
【代理人】	
【識別番号】	100089705
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【弁理士】	
【氏名又は名称】	社本 一夫
【電話番号】	03-3270-6641
【選任した代理人】	
【識別番号】	100076691
【弁理士】	
【氏名又は名称】	増井 忠武
【選任した代理人】	
【識別番号】	100075270
【弁理士】	
【氏名又は名称】	小林 泰
【選任した代理人】	
【識別番号】	100080137
【弁理士】	
【氏名又は名称】	千葉 昭男
【選任した代理人】	
【識別番号】	100096013
【弁理士】	
【氏名又は名称】	富田 博行
【選任した代理人】	
【識別番号】	100107386
【弁理士】	
【氏名又は名称】	泉谷 玲子
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	051806
【納付金額】	21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する前記形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 2】

前記遺伝子が、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子である、請求項 1 に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 3】

組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子が、HGF、FGF、VEGF、PDGF、インターロイキン、GCSF、MCSF、SCF、IFN、Crx、Otx2 からなる群から選択される細胞の分化・増殖制御活性または細胞の機能制御活性を有するタンパク質若しくはペプチドをコードする遺伝子、あるいはCTLA4-Ig、CD40-Ig、IL-10、TGF- β 、I κ B からなる群から選択される免疫抑制に関連する因子をコードする遺伝子である、請求項 1 に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 4】

前記ベクターが、アデノウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクターである、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 5】

アデノウイルスベクターがHGF 遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターである、請求項 4 記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 6】

センダイウイルスベクターがFGF 2 遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターまたはCTLA4-Ig 遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターである、請求項 4 に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 7】

骨髄関連細胞が、骨髄細胞、骨髄由来細胞である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 8】

前記組織が疾患組織である、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 9】

疾患が炎症性疾患である、請求項 8 に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 10】

疾患が肝疾患である、請求項 8 に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 11】

肝逸脱酵素値を下げる、請求項 10 に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 12】

前記組織が移植臓器の組織である、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 13】

前記組織が皮膚移植後の皮膚組織である、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 14】

末梢血管に投与するための、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の形質転換骨髄関連細胞。

【請求項 15】

哺乳動物から取り出された骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝

子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞の調製方法。

【請求項 16】

形質転換骨髄関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組織の維持および／または修復に関連する骨髄関連細胞

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された、組織の維持および／または修復に関連する形質転換骨髄関連細胞、および該細胞の利用に関する。

【背景技術】

【0002】

従来の医療は、疾患部位である障害を受けた臓器や組織を早期に発見し、疾患の病因を突き止めるとともに、早期のうちに障害部位を切除することを治療目的とするものが主流であった。こうした治療は、切除後に残存する臓器または組織の自然治癒（または回復）能力に依存することが大きかった。しかしながら、このような治療を施す場合であっても、切除量が一定限度を超えてしまえば、臓器または組織本来の機能が回復することは困難となる。こうした患者に対しては、臓器や組織を再生するような治療を施すか、あるいは生体外から移植によって補足する必要がある。

【0003】

最近、再生医療を目指す基礎研究が進み、幹細胞を用いた中枢神経機能の再生、筋ジストロフィー、パーキンソン病等の重篤な疾患の治療への期待が高まってきた。再生医療の基盤となる幹細胞は、分化の過程において階層的であり、より未分化な幹細胞は自己複製能が高い。骨髄細胞に含まれる骨髄幹細胞はより未分化な細胞であり、多分化能を有し、胚葉を越えて分化可能であることが報告されている（Jiangら、2002）。また、骨髄細胞を用いた骨・軟骨再生、皮膚再生などの組織工学の分野においては、すでに臨床応用されている（黒柳、2003）。一方、再生医療においては、非自己の細胞だけでなく、自己の細胞を使用する研究も進み、自己の骨髄細胞をドナーソースとして、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞、肝細胞へと分化誘導させ、これらを用いて細胞療法を行う戦略が考案されている（高橋、2002）。

【0004】

一方、臓器および組織は実質細胞のみで構成されているわけではなく、これらは、細胞が接着する足場となる細胞外マトリックスや非実質系（または間葉系）細胞などの複数の構成因子によって構築されている。したがって、単に、疾患の原因となる標的細胞を除去または治癒することを目的とする治療法によっては、本来の大きさおよび機能を有する臓器および組織まで修復させることは困難である。

【0005】

最近、骨髄移植後の患者では複数の臓器および組織において、移植骨髄細胞由来の細胞が存在することが明らかになり、骨髄細胞の組織回復に何らかの作用している可能性が示唆されている（Krauseら、2001）。また、生体外で遺伝子導入した間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell：MSC）を生体にもどすことによって癌の治療効果を高めることも報告されている（Ohlssonら、2003）。このように骨髄幹細胞や間葉系幹細胞は、臓器および組織の再生・回復において極めて重要な役割を果たしているといえる。

【非特許文献1】 Jiang, Y. et al., Nature, 418, 41-49 (2002)

【非特許文献2】 黒柳能光、日本再生医療学会雑誌「再生医療」、Vol. 2、No. 3、39-45 (2003)

【非特許文献3】 高橋淳、日本再生医療学会雑誌「再生医療」、Vol. 2、No. 2、67-74 (2002)

【非特許文献4】 Krause, D. S. et al., Cell, 105, 369-377 (2001)

【非特許文献5】 Ohlsson, L. B. et al., Exp. Mol. Pathol., 75, 248-255 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する形質転換骨髄関連細胞を提供することである。また、本発明の目的は、哺乳動物から取り出された骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞の調製方法を提供することである。

【0007】

本願発明において、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞を調製し、該細胞を利用することにより、生体の組織の維持および修復に関連する疾患の診断・治療が可能になる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前述したように、骨髄幹細胞や間葉系細胞は再生医療において重要な役割を果たすと考えられている。従来、生体内で癌化した特定の細胞を死滅させることを目的として、特定の遺伝子を導入した間葉系細胞を生体内に投与するという治療は行われていた。しかしながら、標的となる細胞を直接死滅させるための治療とは異なり、臓器や組織が本来有する自然治癒力を発揮させることによって疾患を治療する方法は知られていなかった。そこで、本発明者らは、組織の維持および／または修復を目指した疾患の診断・治療を目的として、特定の遺伝子を導入した形質転換骨髄関連細胞を調製することを目指した。具体的には、本発明者らは、骨髄関連細胞に予め組織の維持または修復に関連する遺伝子を組み込んだベクターを導入し、疾患モデルの実験動物に形質転換した骨髄関連細胞を投与することによって、疾患組織の機能を回復させることに成功し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞を提供することにより、再生医療の分野における該細胞の多様な必要性を満たすのを援助する。

【0009】

すなわち、本発明によれば、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する前記形質転換骨髄関連細胞が提供される。

【0010】

本発明の形質転換骨髄関連細胞に導入される遺伝子は、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子を含む。

【0011】

本発明の形質転換骨髄関連細胞に導入される遺伝子を組み込むベクターは、一般的に、ヒト、マウス等の哺乳動物由来の細胞において遺伝子発現を可能にすものであれば特に限定されない。好ましくは、ウイルスベクター、特に組換えアデノウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクターである。前記遺伝子を組み込んだベクターの好ましい態様は、HGF遺伝子を担持したアデノウイルスベクター(a d e x H G F)、F G F-2を担持しFフラグメントが欠失させたセンダイウイルスベクター(F G F 2-SeV/ΔF)、C T L A 4-I gを担持しFフラグメントを欠失させたセンダイウイルスベクター(C T L A 4 I g-SeV/ΔF)、より好ましくはa d e x H G F、F G F 2-SeV/ΔFである。本発明の一態様において、ヒト用の組換えセンダイウイルスベクターとしては、h F G F 2-SeV/ΔF、h C T L A 4 I g-SeV/ΔFが使用できる。

【0012】

本発明に使用される骨髄関連細胞は、骨髄細胞、骨髄由来細胞を含む。

本発明の形質転換骨髄関連細胞によって維持および／または修復される組織は、典型的には、疾患組織である。また、組織本来の機能を維持させることを目的とする場合におい

ては、疾患組織に限定されない。疾患組織には、炎症性疾患、肝疾患、免疫性疾患、癌疾患、遺伝子疾患が例示される。好ましくは、炎症性疾患、肝疾患、癌疾患、より好ましくは、炎症性疾患、肝疾患である。

【0013】

本発明の一態様において、本発明の形質転換骨髄関連細胞の使用により、肝逸脱酵素値を下げることができる。

本発明の一態様において、移植臓器の機能を維持しまたは免疫系を抑制し、移植臓器の生着を促進することを目的としてもよく、組織は、例えば、皮膚移植後の皮膚組織であってもよい。

【0014】

本発明の形質転換骨髄関連細胞は、これらに限定されないが、末梢血管内、皮下、筋肉内、腹腔内、気道内、脳室内、髄腔内、胸腔内に投与することができる。好ましくは、末梢血管内、皮下への投与、より好ましくは、末梢血管内、皮下への投与である。

【0015】

本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を調製する方法が提供される。本発明の方法は、典型的には、哺乳動物から骨髄関連細胞を取り出し、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む。

【0016】

本発明によれば、形質転換骨髄関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用法が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の説明のために、好ましい実施形態に関して詳述する。

（1）骨髄関連細胞

本発明の形質転換骨髄関連細胞に使用する骨髄関連細胞には、骨髄細胞、骨髄由来細胞、あるいはその他の造血幹細胞および血液中の細胞成分が含まれる。好ましくは、骨髄細胞、骨髄由来細胞である。骨髄細胞は、骨髄を構成する細胞の総称であり、造血に關与する前駆細胞の集団である。これにより、骨髄細胞には、造血幹細胞を多く含み、造血幹細胞としては、CD34陽性細胞が例示される。分化の最終段階である赤血球は、造血幹細胞から分化した原赤芽球、前赤芽球、多染色赤芽球、正常赤芽球を経て形成したものである。また、白血球は、顆粒の染色性により好中性白血球、好エオシン性白血球、好塩基性白血球、リンパ球、単球などに分類される。特に、リンパ球は、骨髄で成熟する細胞と胸腺で成熟する細胞があり、胸腺で成熟するものはT細胞と考えられ、一方、骨髄で成熟するものはB細胞と考えられている。

【0018】

本明細書において、「骨髄細胞」というときは、上記の通り、骨髄を構成する細胞のうち造血系に關与する前駆細胞群を示すものとし、特定の細胞に限定しない。また、前記造血幹細胞は、通常、骨髄に多く存在するが、化学療法後の骨髄造血の回復期やG-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）使用後には、末梢血中にも現れることが知られ、このような造血幹細胞を特に末梢血幹細胞と称する。本発明の一態様において、末梢血幹細胞も含まれる。また、臍帯血中にも造血幹細胞が存在することが知られており、臍帯血中の造血幹細胞含まれる。

【0019】

本明細書において、「骨髄由来細胞」は、骨髄に由来する抗体産生細胞の前駆細胞であるB細胞を含む。B細胞は、胎生期では肝臓で、生後では骨髄で幹細胞より分化する細胞であるが、分化過程でIg遺伝子座の活性化、リコンビナーゼ遺伝子産物発現に伴いIGH鎖の再編成が誘導され、 μ 鎖が発現する。この時期の細胞をプレB細胞と呼ぶ。プレB細胞における μ 鎖発現は続いて誘導されるB細胞成熟に重要な役割を果たすと考えられている。さらに、L鎖再編成が誘導されたB細胞は、抗原刺激により抗体産生細胞へと分化する。また、B細胞以外の血液中の各種細胞成分、例えば、血小板、赤血球、顆粒球、T

細胞なども含まれる。

【0020】

また、骨髓細胞を得るには、骨髓または他の造血源中の他の細胞から多能性の幹細胞を単離することが必要である。骨髓細胞は、骨髓源、例えば腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊椎または他の骨腔から得ることができる。造血幹細胞の他の入手源は、胚卵黄包、胎児肝臓、胎児および成人の脾臓、成人末梢血液および臍帯血をはじめとする血液などが含まれる。胎児骨または他の骨源からの骨髓の単離に際しては、骨から洗い出すのに適当な平衡塩溶液を用いることができ、一般には、約5－25 mMの低濃度の許容し得る緩衝液と一緒にしたウシ胎児血清若しくは他の天然性因子を補った平衡塩溶液を用いることができる。好ましくは、緩衝液は、Hepes、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液である。他の方法としては、常法に従って、骨から骨髓を吸引することができる。例えば、マウス的大腿骨や脛骨由来の骨髓細胞の採取については、Terai, S., et al., J. Biochem. 134, 551－558 (2003)に記載の方法に従って行うことができる。

【0021】

骨髓由来細胞を得るには、前記方法で得られる骨髓から、骨髓由来細胞の膜表面に提示された抗原を指標として分離することができる。このような骨髓由来細胞を分離する装置としては、FACS（ベクトンディッキンソン）が例示される。また、細胞表面に提示された抗原に対する分子を磁気ビーズ等に吸着させ、骨髓由来細胞を分離することもできる。

【0022】

本発明において使用される骨髓関連細胞には、具体的には、脊椎動物、好ましくは哺乳動物由来の細胞、例えば、ヒト由来、マウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、またはサル由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが含まれる。

【0023】

(2) 本発明の形質転換骨髓関連細胞

本発明の形質転換骨髓関連細胞は、典型的には、遺伝子を組み込んだベクターが導入され形質転換した骨髓関連細胞である。形質転換骨髓関連細胞には、本発明の特徴である組織の維持および／または修復する機能を有する限り、形質転換されていない骨髓関連細胞も含まれる。

【0024】

骨髓関連細胞の形質転換に使用する遺伝子は、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髓関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子を含む。

【0025】

組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髓関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子は、形質転換された骨髓関連細胞において発現され、当該遺伝子産物が組織の維持および／または修復に直接有用なものでよい。あるいは当該遺伝子産物が、骨髓関連細胞が本来有する組織の維持および／または修復する機能を、直接的若しくは間接的に補助する機能を有するものであってもよい。本発明に使用しうる遺伝子の一態様として、HGF、FGF、VEGF、PDGF、インターロイキン、GSF、MCSF、SCF、IFN、CrxおよびOtx2からなる群から選択される、細胞の分化・増殖制御活性および様々な機能制御活性を有するタンパク質またはペプチドをコードする遺伝子、あるいはCTLA4-Ig、CD40-Ig、IL-10、TGF- β 、IkBなどの免疫抑制に関連する因子をコードする遺伝子が含まれる。こうした遺伝子の核酸配列の情報は、遺伝子データベース（例えば、NCBI）から入手可能である。したがって、当業者であれば、入手した遺伝子情報を利用することにより、発現ベクター等に組み込むことが可能である。

【0026】

本明細書において、「細胞の分化・増殖制御活性」とは、細胞を量的にコントロールし、目的の機能を有する細胞を増加させる活性をいう。

本明細書において、「細胞の機能制御活性」とは、細胞の機能を質的にコントロールし、既存の細胞において目的の機能を向上させる活性をいう。

【0027】

本明細書において、「免疫抑制に関連する因子」とは、免疫反応を弱める、回避する、あるいは積極的に免疫寛容を導く活性を有するタンパク質、ペプチドをいう。

本明細書において、「マーカー」とは、組織または細胞の免疫組織学的染色または直接または間接免疫蛍光染色に適したタンパク質をコードする遺伝子をいう。好ましくはGFP、Liv2、HNF4、A6、アルブミン、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、SEAP、より好ましくはGFP、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、さらにより好ましくはGFPである。なお、GFPは、緑色蛍光蛋白質（green fluorescent protein）の略称である。

【0028】

これらのマーカー遺伝子は、形質転換された骨髄関連細胞において発現され、マーカー遺伝子の種類に応じた公知の検出方法によって検出可能である。例えば、GFPは、490nmないし520nmの範囲で蛍光検出することが可能である。よって、直接または間接免疫蛍光染色によって、前記骨髄細胞の組織における局在を蛍光顕微鏡を用いて観察することができる。

【0029】

さらに、GFPの変異体でより強い蛍光を発するEGFP（enhanced green fluorescent protein）、YFP（yellow fluorescent protein）、BFP（blue fluorescent protein）、RFP（red fluorescent protein）（例えば、Clontech社より入手可能）などもマーカーとして使用可能である。

【0030】

骨髄関連細胞に遺伝子を組み込むことができるベクターとしては、簡単には当該技術分野において入手可能な発現ベクターである。発現ベクターの種類は、骨髄関連細胞において、所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されない。例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター等が含まれる。ウイルスベクター、特にアデノウイルスベクター、センダイウイルスベクター、AAV、レンチウイルスベクターを含むレトロウイルスベクターなどが好ましい。特に好ましくはアデノウイルスベクター、センダイウイルスベクターである。

【0031】

ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法および遺伝子発現は、村松、山本編集、「実験医学別冊 新訂 新遺伝子工学ハンドブック」改訂版（羊土社）、1999年、p. 202-215に準じて行うことができる。ウイルスベクターは動物培養細胞における発現効率が高いことで知られている。後述する実施例1に記載したように、骨髄細胞での遺伝子発現は、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクターともに80%以上の細胞で認められた。こうしたウイルスベクターを用いることによって、遺伝子導入した細胞を死滅させることなく、遺伝子発現を行うことができ、該遺伝子の機能を調べることも可能となる。また、組換えウイルスベクターの調製法は極めて非効率であることが知られているが、例えば、COS-TPC法（Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320-1324 (1996))を採用することにより、調製効率を高めることができる。

【0032】

組換えウイルスベクターの好ましい態様は、adexHGF（HGF遺伝子を担持したアデノウイルスベクター）、hFGF2-SeV/ Δ F（hFGF遺伝子を担持し、Fフラグメントを欠失させたセンダイウイルスベクター）、hCTLA4Ig-SeV/ Δ F（hCTLA4（cytolytic T lymphocyte associate antigen-4）Igを担持し、Fフラグメントを欠失させたセンダイウイルスベクター）である。より好ましくは、adexHGF、hFGF2-SeV/ Δ Fである。

具体的には、後述する実施例 2 に記載したように、本発明の形質転換骨髄関連細胞は、 α dexHGF、hF GF 2-S e V/ Δ F を感染させることによって調製することができる。

【0033】

本発明の一態様においては、ウイルスベクターに限定されず、動物細胞に通常使用される組換えベクターを使用することもできる。プラスミド等のベクターに遺伝子を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 1 (2001) に記載の方法が挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、大腸菌 DH5 α 、DH10BAC、または XL-1 Blue 等）に塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、PEG などの化学的な処理による方法によって導入される。さらに、組換え発現ベクターの構築は、常法に従って行うことができ、例えば、制限処理および連結作業を必要としない Gateway システム（インビトロジェン社）を用いて行うこともできる。発現ベクターの種類は、特に限定されないが、例えば、哺乳類細胞用発現ベクターとしては pFLAG-CMV1、p cDNA3. 1、pGreenLantern などが好ましい。本発明の形質転換骨髄関連細胞は、組換え発現ベクターを骨髄関連細胞に導入することによって得ることができる。

【0034】

本発明の一態様において、維持および／または修復の対象となる組織には、疾患組織が含まれる。ここで、疾患とは、細菌感染、ウイルス感染、アルコール摂取、薬物投与、癌化、遺伝子発現の異常などによって、生体の一部または全部の臓器または組織が正常の機能を維持できなくなった状態、またはこのような状態にある患者をいう。限定されるわけではないが、疾患には、炎症性疾患、肝疾患、免疫性疾患、癌疾患、遺伝子疾患などが含まれる。本発明の一態様において、炎症性疾患には、肝疾患が含まれる。好ましくは、肝障害、肝不全、肝炎、肝硬変、脂肪肝、肝癌より好ましくは、肝障害、肝不全、肝炎である。

【0035】

本発明の一態様において、本発明の形質転換骨髄関連細胞の使用により、維持および／または修復される対象は、臓器であってもよい。臓器には、肝臓、腎臓、心臓が例示される。

【0036】

本発明の一態様において、維持および／または修復の対象となる組織には、組織移植後の組織が含まれる。限定されるわけではないが、移植組織には、皮膚組織、各種の臓器（例えば、肝臓、腎臓、心臓）の組織が含まれる。さらに、移植組織は、自己、非自己のいずれの組織であってもよい。また、移植組織は、生体から取り出した組織に限定されず、生体から細胞または組織の一部を取り出し、生体外において培養して増殖させた培養組織、あるいは該細胞または組織を生体適合材料に組み込んだ人工培養組織であってもよい。

【0037】

本発明の一態様において、本発明の

本明細書において、組織の「維持および／または修復」とは、組織または組織を構成する細胞がその機能を一定に保つこと、疾患によって損なった機能を一定レベルにまで回復すること、あるいは疾患部位の切除後における組織の再構築（再生）をいう。例えば、本発明の一態様において、肝疾患における肝逸脱酵素である GOT、GPT、LDH の測定値を減少させることができる。ここで、本発明の形質転換骨髄関連細胞の使用により、「肝逸脱酵素値を下げる」とは、肝疾患における肝逸脱酵素値が、 $1/3$ 、好ましくは $1/5$ 、より好ましくは $1/10$ 、さらに好ましくは $1/20$ 、さらにより好ましくは $1/30$ 、最も好ましくは正常値まで下がることをいう。後述する実施例 2 に記載したように、本発明の形質転換骨髄関連細胞は、肝疾患の GOT、GPT、LDH をそれぞれおよそ 1

／23、1／22、1／14まで下げることができる。なお、GOTは、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼの略称であり、GPTは、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼの略称であり、LDHは、乳酸デヒドロゲナーゼの略称である。

【0038】

本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を安全かつ効果的に投与することができる。そのような条件が満たされる限り、末梢血管内、皮下、筋肉内、局所、直腸内、腹腔内、経口、気道内、脳室内、髄腔内、胸腔内への投与であってもよい。好ましくは、末梢血管内、皮下への投与、より好ましくは、末梢血管内、皮下への投与である。投与剤形は、当業者であれば、前記投与経路において適切な剤形を選択することができ、特に限定されない。例えば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を緩衝溶液などに懸濁した溶液剤形として使用可能である。一般的に、投与時の形質転換骨髄関連細胞の使用濃度は、溶液剤形の場合は、1日あたり細胞密度としては約 1×10^4 cells/mlないし約 1×10^{11} cells/mlであり、投与量は、約1mlないし約1000mlである。また、1日あたりの量を適宜数回に分けて投与することもできる。当業者であれば、投与される疾患の年齢、体重、症状、投与経路、投与機関、治療経過、投与剤形に応じて変化させることはできる。

【0039】

本発明によれば、哺乳動物から取り出した骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞を調製する方法を提供することができる。本発明の形質転換骨髄関連細胞を調製する方法には、(i)骨髄関連細胞を取り出すこと、(ii)ベクターに遺伝子を組み込むこと、および(iii)(ii)で調製したベクターを(i)の骨髄関連細胞に導入すること、が含まれる。各工程で使用可能な手法は、上述した通りである。

【0040】

本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用法を提供することができる。

本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を生体内に投与することを含む、組織の維持および／または修復する方法を提供することができる。

【0041】

本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を用いて疾患を診断する方法を提供することができる。本発明の方法は、マーカー遺伝子を組み込んだベクターが導入された、本発明の形質転換骨髄関連細胞を生体内に投与し、疾患組織における修復過程を観察することによって、行うことができる。

【0042】

本発明の一態様においては、マーカー遺伝子としてGFPをコードする遺伝子をウイルスベクターに組み込んだadexGFP、GFP-SeV／ ΔF などが使用できる。より具体的には、後述する実施例3に記載したように、ラットを用いた場合には、採取した骨髄細胞にadexGFPまたはGFP-SeV／ ΔF を導入し、形質転換した骨髄細胞をラットの末梢血管に投与する。骨髄細胞の採取についての詳細な手法については、Teraiら(2003)の報告(前述)に従って行うことができる。ラットに投与して所定時間後(例えば、24時間後、48時間後)に、ラットから組織(例えば、肝臓、肝組織)を採取し凍結乾燥後に組織切片を作成する。このような組織の採取、固定法、切片の作製などは、常法に従って行うことができる。組織における修復過程の経過観察は、所定時間後の各組織を、例えば、直接または間接免疫蛍光染色によって、前記骨髄細胞の組織における局在を蛍光顕微鏡を用いて行うことができる。蛍光染色による組織観察は、Teraiら(2003)、Liら(2000)の報告(ともに前述)に記載した手法に準じて行うことができる。当業者であれば、組織観察は、使用するマーカー遺伝子の種類に応じて適切なものを使用可能である。

【実施例】

【0043】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

当業者は、本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0044】

実施例1 遺伝子発現の評価

骨髓細胞における遺伝子発現を評価するために、GFP遺伝子搭載アデノウイルスベクター（*adexGFP*）、GFP遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（*GFP-SeV/ΔF*）を用いて行った。骨髓細胞は、雄ウイスター系ラット（10-12週齢、体重250-300g/匹；日本クレア）の大腿骨から採取した。骨髓細胞の採取は、Teraiらの報告（前述）に記載されている方法に準じて行った。調整した骨髓細胞懸濁液を24ウェルプレート（コーニング）にそれぞれ1mlずつ播種した。直ちに、*adexGFP*は20MOI、*GFP-SeV/ΔF*は10MOIの濃度で培養した骨髓細胞に感染させた。マグネットスターラーで15分間攪拌し、その後、37℃で30分間培養した。この工程をさらに1回行った。続いて、骨髓細胞をPBSで2回洗浄し、生理食塩水1ml/ウェルを加え、遺伝子導入48時間後に、骨髓細胞を回収し、FACS（ベクトンディッキンソン）にて遺伝子発現を評価した。

【0045】

骨髓細胞での遺伝子発現は、*adexGFP*、*GFP-SeV/ΔF*ともに80%以上の細胞で認められた。また、遺伝子発現強度（*mean channel shift*）は、*adexGFP*では 12.6 ± 0.2 、*GFP-SeV/ΔF*では 16.6 ± 0.4 であり、センダイウイルスの方が優れていた。なお、対象群の非感染細胞では、 1.9 ± 0.5 であった。

【0046】

実施例2 肝疾患動物モデルにおける肝機能の修復

疾患組織の修復における本発明の形質転換骨髓関連細胞における効果を調べるために、実験動物を用いて検討した。動物は、実施例1と同様の雄ウイスターラットを使用した。肝疾患として急性肝不全モデルは、ラットに四塩化炭素（ CCl_4 ；Sigma）を0.4ml/kg/匹で腹腔内注射することによって作成した。骨髓細胞の採取は、Teraiらの報告（前述）に記載されている方法に準じて行った。同系ラットの大腿骨から採取した骨髓細胞は、平衡塩溶液に 1×10^8 cells/mlになるように調整した。該細胞に導入する遺伝子は、HGFまたはhFGF-2をコードする遺伝子であり、それぞれの遺伝子を組込んであるHGF遺伝子搭載アデノウイルスベクター（*adaxHGF*；理研ジーンバンク、RDB No. 1553）、hFGF-2遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（*hFGF2-SeV/ΔF*；Li, O. H. et al., J. Virol., 74, 6564-6569 (2000), Masaki, I. et al., Circ. Res., 90, 966-973 (2002))を組換えウイルスベクターとして使用した。

【0047】

調整した細胞懸濁液を24ウェルプレート（コーニング）にそれぞれ1mlずつ播種した。直ちに、*adexHGF*は20MOI、*hFGF2-SeV/ΔF*は10MOIの濃度で培養した骨髓細胞に感染させた。マグネットスターラーで15分間攪拌し、その後、37℃で30分間培養した。この工程をさらに1回行った。続いて、骨髓細胞をPBSで2回洗浄し、生理食塩水1ml/ウェルを加え、投与のための骨髓細胞の懸濁液として準備した。一方、 CCl_4 投与4時間後、準備した骨髓細胞をラットの末梢静脈（尾静脈）から1ml（ 1×10^8 cells/ml）注射し、 CCl_4 投与24時間後の血清を採取し、肝逸脱酵素（GOT、GPT、LDH）値を測定した。GOTの酵素活性はシカリキッドAST、GPTの酵素活性はシカリキッドALT、LDHの酵素活性はシカリキッドLDHJ（全て、関東化学）を用いて測定した。

【0048】

ラット急性肝不全モデルでのC C 1₄投与24時間後の肝逸脱酵素（GOT、GPT、LDH）の測定値を表1に示す。正常値は、GOT、GPT、LDHいずれも30IU／l以下である。

【0049】

表1 形質転換骨髓細胞による肝不全モデルの肝逸脱酵素値の改善

【0050】

【表1】

	GOT	GPT	LDH
未治療群	3,743±855	2,656±379	8,427±1895
骨髓細胞のみ	755±321	618±284	2,720±630
adexHGF 導入 骨髓細胞	482±163	279±94	1,327±418
HFGF2-SeV/ΔF 導入骨髓細胞	163±79	119±81	584±117

(単位：IU／l)

【0051】

HGFまたはhHGF-2の遺伝子を導入した骨髓細胞を投与することにより、未治療群に比べて、肝逸脱酵素値の顕著な低下が観察された。HGFとhHGF-2とを比較した場合、hHGF-2の方がその効果が大きかった。未治療群と比較して、GOT値は約1／23、GPT値は約1／22、LDH値は約1／14まで減少した。以上の結果は、肝障害が進行している過程で、遺伝子導入骨髓関連細胞を末梢静脈から投与することで肝障害の修復、治療が促進することを示している。

【0052】

実施例3 組織修復の経過観察

急性肝不全モデルのラットの肝組織における修復過程は、GFPなどのマーカー遺伝子導入骨髓細胞を投与することにより検討することができる。adexGFPまたはGFP-SeV／ΔFを遺伝子導入した骨髓細胞をラットの末梢血管に投与し、所定時間後に、ラットから肝臓を採取し凍結乾燥後に肝組織切片を作成することができる。肝組織における修復過程の経過観察は、所定時間後の各肝組織を、直接または間接免疫蛍光染色によって、前記骨髓細胞の組織における局在を蛍光顕微鏡を用いて行うことができる。蛍光染色による組織観察は、Teraiら（2003）、Liら（2000）の報告（ともに前述）に記載した手法に準じて行うことができる。

【産業上の利用可能性】

【0053】

本発明により、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髓関連細胞を用いることによって、疾患組織の修復を行うことができた。疾患には、炎症疾患に限定されることはなく、免疫疾患、癌疾患、遺伝子疾患などを問わず、本発明の形質転換骨髓関連細胞が疾患・病態の組織修復に関与する可能性が示された。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 組織の維持および／または修復に関連する形質転換骨髄関連細胞を提供することを目的とする。さらに、本発明の形質転換骨髄関連細胞を用いる、疾患組織の診断および治療方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明の形質転換骨髄関連細胞は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する形質転換骨髄関連細胞である。また、本発明の形質転換骨髄関連細胞の調製方法は、哺乳動物から取り出された骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む。

【選択図】 なし

出願人履歴

5 9 5 1 5 5 1 0 7

19951101

新規登録

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

株式会社ダイナベック研究所